



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 55 861 A1** 2004.06.17

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 55 861.2**
(22) Anmeldetag: **29.11.2002**
(43) Offenlegungstag: **17.06.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 33/04**
A61K 31/593, A61K 31/203, A61K 31/19

(71) Anmelder:
Axxima Pharmaceuticals AG, 82152 Planegg, DE

(72) Erfinder:
Herget, Thomas, 82152 Planegg, DE

(74) Vertreter:
Zimmermann & Partner, 80331 München

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Gegen Hepatitis C-Virusinfektionen nützliche Verbindungen und Substanzen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen chemische Verbindungen und Substanzen, die wirksam gegen Hepatitis C Virus-(HCV)-Infektionen sind. Weiterhin betrifft die Erfindung Zusammensetzungen, umfassend diese Verbindungen und/oder Substanzen, Verfahren zur Verhinderung von HCV-Infektionen sowie die Verwendung der Verbindungen und/oder Substanzen für die Herstellung von Zusammensetzungen, die geeignet sind zur Prophylaxe gegen und/oder zur Behandlung von HCV-Infektionen. Geeignete Verbindungen und Substanzen gemäß der vorliegenden Erfindung sind Selen, Selen-salze, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁₋₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbon-säure (AHPN).

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft chemische Verbindungen und Substanzen, die gegen Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektionen wirksam sind. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die diese Verbindungen und/oder Substanzen umfassen, Methoden zur Verhinderung von HCV-Infektionen sowie die Verwendung der Verbindungen und/oder Substanzen für die Herstellung von Zusammensetzungen, die zur Prophylaxe gegen und zur Behandlung von HCV-Infektionen geeignet sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion ist eine wesentliche Ursache für chronische Hepatitis, Zirrhose und hepatozelluläre Karzinome. Die WHO schätzt, dass in etwa 3% der Weltbevölkerung, oder 170 Millionen Personen, mit dem Hepatitis C-Virus infiziert wurden. In den USA wird geschätzt, dass 3,9 Millionen Amerikaner infiziert wurden (CDC-Datenblatt, September 2000). Über 80% der HCV-infizierten Individuen entwickeln chronische Hepatitis, was mit Krankheitszuständen verbundenen ist, die von asymptomatischen Trägerzuständen bis wiederholten Entzündungen der Leber und schweren chronischen Lebererkrankungen reichen. Es wird erwartet, dass über einen Zeitraum von 20 Jahren mehr als 20% der chronischen HCV-Patienten gefährdet sind, chronische Zirrhose zu entwickeln, oder dass eine Entwicklung zum hepatozellulären Karzinom eintritt. Leberversagen aufgrund chronischer Hepatitis C ist der häufigste Grund für eine Lebertransplantation. Transplantationen ausgenommen, schätzt die CDC, dass die medizinischen und Arbeitsausfall-Kosten wegen HCV jährlich etwa 600 Millionen US-Dollar betragen. HCV wird hauptsächlich über Blut und Blutprodukte übertragen. Aufgrund der seit der Mitte des Jahres 1992 routinemäßig durchgeführten Untersuchungen der Blutbestände sind neue transfusionsbedingte Fälle extrem selten und wurden von dem Drogenkonsum mittels Injektionen als dem höchsten Risikofaktor für die Infektion mit dem Virus übertroffen. Es existiert auch eine sexuelle Übertragungsrouten, die allerdings ineffizient ist, und eine 6%ige Übertragungsrate von infizierten Müttern auf ihre Kinder, die im Falle einer Co-Infektion mit HIV höher ist. Zu einem bestimmten Prozentanteil bleibt die Art der Übertragung unbekannt. Es wird trotz eines signifikanten Rückgangs der Eintrittshäufigkeit in den 1990er Jahren erwartet, dass die Anzahl der Todesfälle (geschätzte jährliche Todesfälle zur Zeit: 8.000 bis 10.000 in den USA) und schweren Erkrankungen aufgrund von HCV sich innerhalb der nächsten 10 bis 20 Jahre verdreifacht [Quellen: CDC-Datenblatt (zugänglich 12/12/00); Houghton M. Hepatitis C Viruses. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley (Ed.) Fields Virology. 1996. Lippencott-Raven Pub., Philadelphia; Rosen HR and Gretch DR, Molecular Medicine To-

day, Vol. 5, 393, Sept. 99; Science 285, 26, July 99; News Focus: The scientific challenge of Hepatitis C; Wong JB et al, Am. J. Public Health, 90, 1562, Oct. 2000; Estimating future hepatitis morbidity, mortality, and costs in the United States).

[0003] Gemäß einer Ankündigung der EASL (European Association for the Study of the Liver) International Consensus Conference on Hepatitis C (26.-28. Februar 1999, Paris, Frankreich) wird eine Kombinationstherapie mit Alpha-Interferon und Ribavirin zur Behandlung von unbehandelten Patienten empfohlen. Monotherapie mit Interferon wurde ebenfalls durch die FDA genehmigt, die dauerhafte Erfolgsrate (HCV RNA bleibt für mehr als 6 Monate nach Ende der Therapie im Serum nicht nachweisbar) beträgt nur 15 bis 20% verglichen mit den 35 bis 45% bei der Kombinationstherapie. Interferone (Intron A, Schering-Plough; Roferon A, Hoffmann-LaRoche; Wellferon, Glaxo Wellcome; Infergen, Amgen) werden dreimal die Woche subkutan injiziert, Ribavirin (Rebetol, Schering-Plough) ist eine oral verabreichte Arznei, die zweimal am Tag gegeben wird. Die empfohlene Behandlungsdauer beträgt 6 bis 12 Monate, in Abhängigkeit des HCV-Genotyps. Experimentelle Formen von langsam freigesetzten pegylierten Interferonen (Pegasys, Hoffmann-LaRoche; PEG-Intron, Schering-Plough) zeigten verbesserte Erfolgsraten (42 bis 82% in Kombination mit Ribavirin) und die Anwendbarkeit (1x wöchentliche Injektion) in kürzlich durchgeführten klinischen Studien (Hepatology 32:4, Teil 2 von 2. Oktober 2000; NEJM 343, 1673, Dezember 2000; NEJM 343, 1666, Dezember 2000). Häufig auftretende Nebenwirkungen der Interferonen-Therapie schließen beispielsweise Müdigkeit, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen, Brechreiz, Fieber, Gewichtsverlust, Reizbarkeit, Depressionen, Knochenmarks-Suppression und reversiblen Haarausfall ein. Die häufigsten Nebenwirkungen von Ribavirin sind Anämie, Müdigkeit und Reizbarkeit, Juckreiz, Hautausschlag, blockierte Nasenwege, Sinusitis und Husten. Schwerwiegendere Nebenwirkungen der Mono- und Kombinationstherapie treten in weniger als zwei Prozent der Patienten auf (NIDDK Information: Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, zugänglich 09.12.99). Einige der Kontraindikationen zu Interferon sind Psychosen oder schwere Depressionen, Neutropenie und/oder Thrombozytopenie, Organtransplantation, ausgenommen der Leber, symptomatische Herzerkrankung, dekompensierte Zirrhose und unkontrollierte Anfälle. Kontraindikationen zu Ribavirin sind Nierenversagen im Endstadium, Anämie, Hämoglobinopathien, schwere Herzerkrankungen, Schwangerschaft, keine zuverlässige Methode der Verhütung (Consensus Aussage der EASL). Außerdem ist die Behandlung von Hepatitis C-Virusinfektionen mit Interferon-Alpha nur bei einer Minderheit der Individuen wirksam. Dies legt nahe, dass das Virus verschiedene Tricks anwendet, um gegen Interferonen resistent zu sein.

[0004] Experimentelle Behandlungen, die keine

neue Formen von Interferon sind, sind Maxamine (Histamin-dihydrochlorid, Maxim Pharmaceuticals), die in Phase-III-Studien mit Interferon kombiniert werden, VX-497 (Vertex Pharmaceuticals), ein IMP-Dehydrogenase-Inhibitor, als weniger toxischer Ribavirin-Ersatz in Phase-II und Amantadin (Endo Labs), ein genehmigtes Arzneimittel gegen Influenza, als dritte Komponente in einer Dreifachtherapie (Phase-II). Inhibitoren für HCV-Enzyme wie beispielsweise Protease-Inhibitoren, RNA-Polymerase-Inhibitoren, Helicase-Inhibitoren, sowie Rybozyme und antisense-RNAs sind in der vorklinischen Entwicklung (Boehringer Ingelheim, Ribozyme Pharmaceuticals, Vertex Pharmaceuticals, Schering-Plough, Hoffmann-LaRoche, Immusol, Merck etc.). Für die Prävention oder den therapeutischen Einsatz steht kein Impfstoff zur Verfügung, aber mehrere Unternehmen versuchen, konventionelle oder DNA-Impfstoffe oder immunstimulierende Agenzien zu entwickeln (beispielsweise Chiron, Merck/Vical, Epimmune, NABI, Innogenetics). Weiterhin wurden Antikörper gegen HCV-Virion entwickelt und sind kürzlich in klinische Versuche eingetreten (Trimera Co., Israel).

[0005] Zusammenfassend ist die zur Verfügung stehende Behandlung für chronische Hepatitis C teuer, nur bei einem bestimmten Prozentanteil der Patienten wirksam und nachteilige Nebenwirkungen sind nicht unüblich.

Beschreibung der Erfindung

[0006] Kürzlich durchgeführte Forschungsarbeiten haben gezeigt wie Zellen miteinander kommunizieren, um innerhalb des menschlichen Körpers das Wachstum und die Aufrechterhaltung der Vielzahl der Gewebearten zu koordinieren. Ein Schlüsselement dieses Kommunikationsnetzwerkes ist die Aussendung eines Signals von dem Äußeren einer Zelle zu ihrem Kern, dass eine Aktivierung oder Unterdrückung von speziellen Genen bewirkt. Dieser Vorgang wird Signal-Transduktion genannt.

[0007] Signal-Transduktion auf der zellulären Ebene bezieht sich auf die Bewegung von Signalen von außerhalb der Zelle nach innen. Die Übertragung der Signale kann einfach sein, wie die mit den Rezeptor-Molekülen der Acetylcholin-Klasse zusammenhängende Übertragung: Rezeptoren, die Kanäle darstellen, die bei Liganden-Wechselwirkung das Passieren von Signalen in der Form von Bewegung kleiner Ionen erlauben, entweder in die Zelle oder aus der Zelle heraus. Diese Ionen-Bewegungen bewirken Änderungen in dem elektrischen Potential der Zelle, das wiederum das Signal entlang der Zelle propagiert. Komplexere Signal-Transduktion bezieht die Kopplung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen mit vielen intrazellulären Ereignissen ein. Diese Ereignisse umfassend die Phosphorylierung durch Tyrosin-Kinasen und/oder Serin/Threonin-Kinasen. Protein-Phosphorylierungen verändern die Enzymaktivitäten und Proteinkonformationen. Das letztend-

liche Ergebnis ist eine Veränderung in der zellulären Aktivität und Veränderungen in dem Programm der Gene, die in der Ziel-Zelle exprimiert werden.

[0008] Signal-Transduktions-Rezeptoren werden in drei allgemeine Klassen eingeteilt:

1. Rezeptoren, die in die Plasmamembran eindringen und eine intrinsische, enzymatische Aktivität aufweisen:

Rezeptoren, die eine intrinsische, enzymatische Aktivität aufweisen schließen solche ein, die Tyrosin-Kinasen sind (beispielsweise PDGF, Insulin, EGF- und FGF-Rezeptoren), Tyrosin-Phosphatasen (beispielsweise CD45 [cluster determinat-45] Proteine von T-Zellen und Makrophagen), Guanylat-Cyclasen (beispielsweise natriuretische Peptid-Rezeptoren) und Serin/Threonin-Kinasen (beispielsweise Activin und TGF-Beta-Rezeptoren). Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität können sowohl die Autophosphorylierung als auch die Phosphorylierung anderer Substrate bewirken.

Weiterhin weisen mehrere Rezeptor-Familien keine intrinsische Enzymaktivität auf, sind aber trotzdem über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen an intrazelluläre Tyrosin-Kinasen gekoppelt. Diese Klasse Rezeptoren schließt alle der Cytokin-Rezeptoren (beispielsweise Interleukin-2-Rezeptor) sowie die CD4 und CD8 Zelloberflächen-Glykoproteine der T-Zellen und den T-Zellen-Antigen Rezeptor ein.

2. Rezeptoren, die in der Zelle an GTP-bindende und hydrolisierende Proteine (G-Proteine genannt) gekoppelt sind:

Rezeptoren der Klasse, die mit G-Proteinen wechselwirken, haben alle eine Struktur, die gekennzeichnet ist durch sieben Domänen, welche sich über eine Membran erstrecken: Diese Rezeptoren werden „Serpentin“-Rezeptoren genannt. Beispiele aus dieser Klasse sind die adrenergen Rezeptoren, Odorant-Rezeptoren und gewisse Hormon-Rezeptoren (Beispielsweise Glucagon, Angiotensin, Vasopressin, und Bradykinin).

3. Rezeptoren, die intrazellulär gefunden werden und bei Ligandenbindung zum Zellkern wandern, wo der Ligand-Rezeptor-Komplex direkt die Gentranskription beeinflusst:

Die übergeordnete Steroid/Thyroid-Hormon-Rezeptor-Familie (beispielsweise Glucocorticoid, Vitamin D, Retinsäure, und Thyroid-Hormon-Rezeptoren) ist eine Klasse von Proteinen, die sich in dem Zellplasma aufhalten und die lipophilen Steroid/Thyroid-Hormone binden. Diese Hormone sind fähig, frei in die hydrophobe Plasmamembran einzudringen. Nach der Bindung des Liganden wandert der Hormon-Rezeptor-Komplex zu dem Kern und bindet sich an spezifische DNA-Sequenzen, was zu einer Veränderung der Transkriptionsraten des damit im Zusammenhang stehenden Gens führt. Wenn die Nachricht den Kern

über einen oder mehrere der oben beschriebenen Wege erreicht, initiiert sie die Modulation spezifischer Gene, was zu einer Produktion von RNA und letztendlich von Proteinen, die eine spezifische biologische Funktion erfüllen, führt. Eine gestörte Aktivität der Signal-Transduktionsmoleküle kann zu einer Fehlfunktion der Zellen und zu Krankheitsprozessen führen. Insbesondere ist eine Wechselwirkung des HCV mit Wirtszellen nötig, damit sich das Virus vervielfältigen kann.

[0009] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Tatsache, dass die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase (P18283) als Folge der HCV-Replikation in den HCV-infizierten Wirtszellen speziell herabreguliert ist. Der antivirale, prophylaktische und/oder therapeutische Einsatz, der in dieser Anmeldung beschrieben wird, konzentriert sich auf spezielle, chemische Substanzen und Verbindungen, die dazu verwendet werden können, die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase heraufzuregulieren. Diese speziellen, chemischen Substanzen und Verbindungen sind Selen, Selensalze, Vitamin D₃ und Retinoide wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀ Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalin-carbonsäure (CD437; AHPN).

[0010] Um neue, pharmazeutisch wirksame Verbindungen zu entwickeln, musste ein potenzielles Target für die medizinische Einwirkung identifiziert werden. Das heißt, der Prozess des Auffindens von pharmazeutisch wirksamen Verbindungen beinhaltet die Target-Identifikation. Details für das Auffinden von geeigneten Targets, um HCV-Infektionen zu behandeln, sind in WO 02/084294 beschrieben.

[0011] Target-Identifikation ist im Wesentlichen die Identifikation einer bestimmten biologischen Komponente, nämlich eines Proteins und seines Zusammenhangs mit bestimmten Krankheitszuständen und Regulierungssystemen. Ein Protein, das bei einer Suche nach einer pharmazeutisch wirksamen, chemischen Verbindung (Medikament) identifiziert wird, wird Target genannt. Dieses Target ist in die Regulierung oder Kontrolle von biologischen Systemen eingebunden, und in seine Wirkung kann mittels eines Medikaments eingegriffen werden.

[0012] Der Begriff „Krankheit“ wird hier so verwendet, dass damit ein erworbener Zustand oder genetischer Zustand beschrieben wird. Eine Krankheit kann das normale biologische Systeme des Körpers verändern, wodurch ein Überschuß oder Unterschluß an einer chemischen Verbindungen hervorgerufen wird (chemisches Ungleichgewicht). Die Regulierungssysteme für diese chemischen Verbindungen beinhalten die Verwendung bestimmter Proteine durch den Körper, um Ungleichgewichte zu detektieren und den Körper zu veranlassen, neutralisierende Verbindungen herzustellen, in einem Versuch das

chemische Gleichgewicht wiederherzustellen.

[0013] Der Begriff „Körper“ wird hier so verwendet, dass damit jedes biologische System, beispielsweise Mensch, Tier, Zellen oder Zellkultur, beschrieben wird.

[0014] Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung Verbindungen, Zusammensetzungen und Verfahren bereitzustellen, die zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Hepatitis C-Virusinfektionen wirksam sind, die aber nicht die oben beschriebenen, negativen Nebenwirkungen aufweisen oder zumindest nicht in dem Maße, wie sie für bekannte Produkte und Methoden berichtet wurden. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch die Lehre der unabhängigen Patentansprüche gelöst. Weitere vorteilhafte Merkmale, Aspekte und Details der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung und den Beispielen der vorliegenden Anmeldung.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0015] Es wurde vormals bereits gezeigt, dass die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase im Körper aufgrund einer HCV-Infektion speziell herabreguliert ist. Diese humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase wurde als diagnostisches und therapeutisches Target zur Behandlung von HCV-Infektionen identifiziert.

Glutathion-Peroxidase:

[0016] Bisher wurden in Säugetieren vier unterschiedliche Spezies der Glutathion-Peroxidase identifiziert, das klassische, zelluläre Enzym, das Phospholipid-Hydroperoxidmetabolisierende Enzym, das Gastrointestinaltrakt-Enzym und das extrazelluläre Plasma-Enzym. Deren Primärstrukturen sind nur wenig miteinander verwandt. Es wurde gezeigt, dass sie durch unterschiedliche Gene codiert werden und unterschiedliche enzymatische Eigenschaften aufweisen. Aufgrund der geringen Menge von reduziertem Glutathion im menschlichen Plasma und der geringen Reaktivität dieses Enzyms, ist die physiologische Rolle des humanen Plasma-Enzyms weiterhin unklar.

[0017] Die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase (GI-GPx) ist auch als Glutathion-Peroxidase-verbundenes Protein 2 (GPRP) oder Glutathion-Hydrogenperoxid-Oxidoreduktase bekannt. Ihr wurde die Hinterlegungsnummer P18283 und die EC-Nummer 1.11.1.9. zugeordnet.

[0018] Die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase (GI-GPx) katalysiert die Reduktion verschiedener organischer Hydroperoxide sowie Hydrogenperoxid mit Glutathion (GSH) als Wasserstoff-Donor ($2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-GS} + 2 \text{ H}_2\text{O}$). Sie hat ein Molekulargewicht von 84.000 und 4 Untereinheiten per Mol Enzym. Das Enzym ist nütz-

lich zur enzymatischen Bestimmung von Lipid-Hydroperoxid.

[0019] GI-GPx gehört der Familie der Selenoproteine an und spielt in den Abwehrmechanismen von Säugetieren, Vögeln und Fischen gegen oxidative Schädigung eine große Rolle, indem es die Reduktion verschiedener Hydroperoxide unter Verwendung von Glutathion als reduzierendem Substrat katalysiert. Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Enzym in den meisten Fällen als ein Mechanismus zum Schutz des zellulären Membransystems gegen peroxidative Schädigung wirkt und dass Selen ein essentielles Spurenelement ist, das eine große Rolle in dieser vorgeschlagenen Funktion des Enzyms spielen könnte. Es ist bekannt, dass sowohl Vitamin E als auch Se als Antioxidantien auch in einem herkömmlichen Mechanismus des oxidativen Stresses als grundlegender Ursache von genetischen Veränderungen wirken.

[0020] Selen wirkt in Säugetier-Systemen vorrangig in der Form von Selenoproteinen. Selenoproteine enthalten Selen als Selenocystein und führen eine Vielzahl von physiologischen Funktionen aus. Siebzehn Selenoproteine wurden identifiziert: Zelluläre oder klassische Glutathion-Peroxidase, Plasma-(oder extrazelluläre) Glutathion-Peroxidase, Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase, gastrointestinale Glutathion-Peroxidase, Selenoprotein P, Iodthyronin-Deiodinase vom Typ 1, 2 und 3, Selenoprotein W, Thioredoxin-Reduktase und Selenophosphat-Synthetase. Von diesen sind die zelluläre und Plasma-Glutathion-Peroxidase die funktionalen Parameter zur Bestimmung des Selen-Status (D.H. Holben, A.M. Smith, J. Am. Diet. Assoc. 1999, 99, 836-843).

[0021] Neben Vitamin E (DL- α -Tocopherol), Vitamin C (L-Ascorbinsäure), Co-Enzym Q10, Zink und Selen gibt es viele weitere Antioxidantien, die zur Verhinderung und /oder Behandlung von HCV-Infektionen durch zumindest teilweise Kompensation der Herabregulierung von GI-GPx angewendet werden können, beispielsweise N-Acetyl-L-Cystein, N-Acetyl-S-farnesyl-L-Cystein, Bilirubin, Kaffeesäure, CAPE, Catechin, Ceruloplasmin, Coelenterazin, Kupfer-Diisopropylsalicylate, Deferoxaminmesylat, R-(-)-Deprenyl, DMNQ, DTPA-Dianhydrid, Ebselen, Ellagsäure, (-)-Epigallocatechin, L-Ergothioneine, EUK-8, Ferritin, Glutathion, Glutathionmonoethylester, α -Liponsäure, Luteolin, Manoalid, MCI-186, MnT-BAP, MnTMPyP, Morinhydrat, NCO-700, NDGA, p-Nitroblau, Propylgallat, Resveratrol, Rutin, Silymarin, L-Stepholidin, Taxifolin, Tetrandrin, Tocopherolacetat, Tocotrienol, Trolox®, U-74389G, U-83836E und Harnsäure (alle erhältlich von Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.).

[0022] Weitere Antioxidantien können ausgewählt werden aus der Gruppe der Carbonsäuren, wie beispielsweise Zitronensäure, und Phenolverbindungen, wie beispielsweise BHA (butyliertes Hydroxyanisol), BHT (butyliertes Hydroxytoluol), Propylgallat,

TBHQ (tert.-butyl Hydrochinon), Tocopherole, Lecithin, Gummis und Guajakharz, THBP (Trihydroxybutyrophenon), Thiodipropionsäure und Dilaurylthiodipropionat und Glycine.

[0023] Oxidative Schädigung wird im Wesentlichen durch freie Radikale, vorzugsweise reaktive Sauerstoff-Zwischenprodukte, verursacht, die bei der normalen, zellulären Respiration oder dem oxidativen Bersten entstehen, wenn phagozytische Zellen bakterien- oder virusinfizierte Zellen zerstören. Um mit der andauernden Erzeugung von potentiell schädigenden Sauerstoffradikalen fertig zu werden, haben eukariotische Organismen eine Vielzahl von Schutzmechanismen entwickelt. Diese umfassen die oben genannten Antioxidantien, die als freie Radikalfänger wirken können und die mit GI-GPx wechselwirken können und/oder welche die Expression und/oder Produktion von GI-GPx aktivieren, stimulieren und/oder erhöhen können. Dieser vorteilhafte Effekt der Radikale auf die Menge an GI-GPx, die in den Zellen generiert wird, konkurriert mit der HCV-induzierten Herabregulierung des GI-GPx und unterstützt die Zellen in ihren Kampf gegen die Hepatitis C-Viren.

HCV-Infektions-Studien:

[0024] Die einzigen zuverlässigen experimentellen HCV-Infektionsstudien wurden an Schimpansen durchgeführt. Bisher steht kein einfaches Zellkultur-Infektionssystem für HCV zur Verfügung. Obwohl eine Anzahl von Berichten publiziert wurde, die Versuche zur in-vitro Vermehrung von HCV in primären Zellen und Zelllinien beschreiben, bleiben Fragen bezüglich der Reproduzierbarkeit, dem niedrigen Expressionsniveau und zuverlässig kontrollierten Nachweismethoden offen (besprochen in: J. Gen Virol. 81, 1631; Antiviral Chemistry and Chemotherapy 10, 99). Daher wurde das von Bartenschlager und Mitarbeitern (Lohmann et al, Replication of subgenomic Hepatitis C-virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285, 110. 1999) beschriebene Replikationssystem für die vorliegend offenbarten Studien verwendet. Dieses Replikationssystem reproduziert einen entscheidenden Teil des HCV-Replikationszykluses, der als System zur Simulation von HCV-Infektionen verwendet wird. Bartenschlagers Gruppe stellte bicistronische, rekombinante RNA her, so genannte „Replikons“, welche das Neomycin-Phosphotransferase(NPT)-Gen sowie eine Version des HCV Genoms tragen, in dem die Sequenzen für die strukturellen HCV-Proteine entfernt waren. Nach der Transfektion der subgenomischen HCV-RNA-Moleküle in die humane Hepatoma-Zelllinie HuH-7 wurden Zellen, welche die effiziente, RNA-abhängige RNA-Replikation der HCV-Replikons unterstützen, auf Grundlage der Co-Amplifikation des NPT-Genes und der resultierenden Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G-418 ausgesucht. Der Einbau von codierender Information in das zelluläre Genom war ein Aus-

schlusskriterium für funktionale Replikons. Es wurden mehrere Linien aus G-418-resistenten Klonen erstellt mit autonom replizierenden, mittels Northern Blotting nachweisbaren HCV-RNAs erstellt. Minus-Strang-RNA-Replikationszwischenstufen wurden mittels Northern Blotting oder metabolischer, radioaktiver Markierung nachgewiesen, und die Produktion von nichtstrukturellen HCV-Proteinen wurde durch Immun-Präzipitation nach metabolischer, radioaktiver Markierung oder mittels Western Blotting gezeigt.

[0025] Mögliche Einflüsse und/oder Abhängigkeiten RNA-abhängiger RNA-Replikation der HCVs und nicht-struktureller Proteine auf die Wirtszellen-Transkription sind der Analyse mit den Clontech cDNA-Arrays, die in den hier beschriebenen Verfahren verwendet werden, zugänglich. HuH-pcDNA3-Zellen sind HuH7-Zellen, die durch Integration eines NPT-Gen tragenden Plasmids (pcDNA3, Invitrogen) gegenüber G-418 resistent sind, und dienen als negative Kontrolle. Drei Replikon-Linien wurden auf Veränderungen in den zellulären Expressionsmustern, verglichen mit den Kontrolllinien, untersucht:

- HuH-9-13: Zelllinie mit persistierenden Replikon I377/NS3-3'/wt, beschrieben in Science 1999, 285, 110-113.
- HuH-5-15: Zelllinie mit persistierenden Replikon I389/NS3-3'/wt, beschrieben in Science 1999, 285, 110-113.
- HuH-11-7: Zelllinie mit persistierenden Replikon I377/NS2-3'/wt, beschrieben in Science 1999, 285, 110-113.

[0026] Diese HCV-Replikon-Zellen dienen als ein System zur Simulation von HCV-infizierten Zellsystemen, insbesondere zur Simulation von HCV-infizierten Säugetieren, einschließlich Menschen. Beeinflussung der zellulären Signalvorgänge durch HCV wird durch die differentielle Genexpression im Vergleich zur zellulären Signalisierung in Kontrollzellen wiedergegeben. Die Ergebnisse dieser Signal-Transduktion-Mikroarray-Analyse zeigte eine signifikante Herabregulierung von GI-GPx. Radioaktiv markierte komplexe cDNA-Proben von HCV-Replikon-Zellen HuH-9-13, HuH-5-15 und HuH-11-7 wurden zu cDNA-Arrays hybridisiert und mit Hybridisierungen mit cDNA-Proben aus HuH-pcDNA-Kontrollzellen, die keine HCV-Replikons enthielten, verglichen.

[0027] Auf Basis der vorliegend berichteten, überraschenden Ergebnisse betrifft ein Aspekt der vorliegenden Erfindung spezielle chemische Substanzen und Verbindungen, die zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Hepatitis C-Virusinfektionen geeignet sind. Insbesondere umfassen diese speziellen Substanzen und Verbindungen Selen, Selensalze, Vitamin D₃ und Retinoide, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (CD437; AH-

PN).

[0028] Weiterhin offenbart die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Hepatitis C-Virusinfektionen in einem Individuum, umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen, oben genannten Verbindungen und Substanzen, die in den Zellen zumindest teilweise die Aktivität von GI-GPx heraufregulieren oder die zumindest teilweise die Produktion von GI-GPx heraufregulieren.

[0029] Ein ähnlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prophylaxe gegen eine und/oder Behandlung einer HCV-Infektion und/oder mit HCV-Infektionen verbundenen Krankheiten in Zellen oder Zellkulturen, umfassend den Schritt der Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen, oben genannten Verbindungen und Substanzen, die zumindest teilweise die Aktivität von GI-GPx heraufregulieren oder die zumindest teilweise die Produktion von GI-GPx heraufregulieren.

[0030] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in einem Individuum oder in Zellen oder Zellkulturen, umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen, oben genannten Verbindungen oder Substanzen, die in den Zellen zumindest teilweise die Aktivität von GI-GPx heraufregulieren oder die zumindest teilweise die Produktion von GI-GPx heraufregulieren.

[0031] Zusätzlich zu den oben genannten Verfahren betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Hepatitis C-Virusinfektion und/oder Krankheiten, die mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehen, in einem Individuum, umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen, oben genannten Verbindungen oder Substanzen, die in dem Individuum zumindest teilweise GI-GPx aktiviert oder welche die Produktion von GI-GPx aktiviert oder stimuliert.

[0032] Ein anderer erfinderischer Aspekt betrifft ein Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung von Hepatitis C-Virusinfektionen und/oder Krankheiten, die mit HCV-Infektionen in Verbindung stehen, in Zellen oder Zellkulturen, umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen, oben genannten Verbindungen oder Substanzen, die zumindest teilweise die Aktivität von GI-GPx aktivieren oder welche die Produktion von GI-GPx aktivieren oder stimulieren.

[0033] Der Begriff „in Verbindung stehenden Krankheiten“ bezieht sich beispielsweise auf opportunistische Infektionen, Leberzirrhose, Leberkrebs, hepatozelluläres Karzinom oder jede andere Krankheit, die zusammen mit einer HCV-Infektion auftreten kann.

[0034] Die Funktion des GI-GPx besteht darin, dass

es Peroxide in Zellen entgiftet und die Zelle vor oxidativer Schädigung schützt. Werden HCV-infizierte Zellen oxidativen Stressbedingungen ausgesetzt, vorzugsweise ausgelöst durch Paraquat oder aus Peroxiden generierten Peroxiden, führt dies im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zu einer herabgesetzten Widerstandsfähigkeit der HCV-infizierten Zellen gegenüber der Toxizität von Radikalen. Somit erlaubt die Erzeugung von künstlichen, oxidativen Stressbedingungen die selektive Abtötung von HCV-infizierten Zellen.

[0035] Beispiele für geeignete radikalbildende Verbindungen (Radikalintiatoren) sind Bipyridyle wie Paraquat, 2,2'-Bipyridyl- und 4,4'-Bipyridylderivate, Bis-6-(2,2'-Bipyridyl)-Pyrimidine, Tris(2,2'-Bipyridyl)-Ruthenium, Peroxide wie Dibenzoylperoxid, Diacetylperoxid, Wasserstoffperoxid, Di-tert.-butylperoxid oder Diazaverbindungen wie Diazaisobutyronitril.

[0036] Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine neue therapeutische Zusammensetzung, die zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines an einer Hepatitis C Virus-(HCV)-Infektion und/oder zumindest an einer mit einer HCV-Infektion assoziierten Krankheit leidenden Individuums geeignet ist, wobei die Zusammensetzung zumindest eine der speziellen chemischen Substanzen und Verbindung ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃ und Retinoiden, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR), und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalin-carbonsäure (CD437; AHPN) umfasst. Ein bevorzugtes Selensalz ist Natriumselenit. Darüber hinaus kann die Zusammensetzung gemäß einem weiteren bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung eine gewisse Menge an all-trans-Retinsäure umfassen.

[0037] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden durch Verfahren zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in einem Individuum oder in Zellen oder Zellkulturen dargestellt, umfassend den Schritt der Verabreichung an ein Individuum oder Zugabe zu den Zellen einer pharmazeutisch wirksamen Menge zumindest einer der speziellen chemischen Substanzen und Verbindung ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃ und Retinoide, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR), und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalin-carbonsäure (CD437; AHPN), wobei die Substanz oder Verbindung zumindest teilweise die Aktivität der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase aktiviert oder steigert oder wobei das Agens zumindest teilweise die Produktion der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase aktiviert oder stimuliert.

[0038] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft neue therapeutische Zusammensetzungen,

die zur Verwendung in den Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines an Hepatitis C Virus und/oder einer damit in Verbindung stehenden Krankheit leidenden Individuums geeignet sind. Diese Zusammensetzungen umfassen zumindest eine der speziellen chemischen Substanzen und Verbindung ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃ und Retinoide, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR), und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalin-carbonsäure (CD437; AHPN), die befähigt sind, die Aktivität von GI-GPx zu steigern oder die Produktion und/oder Expression von GI-GPx zu aktivieren oder stimulieren.

[0039] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können weiterhin pharmazeutisch geeignete Träger, Arzneimittelträger und/oder Verdünnungsmittel umfassen.

[0040] Der Begriff „Aktivator“, wie er hier verwendet wird, bezeichnet jede chemische Verbindung, die eine Heraufregulierung, Aktivierung, Stimulation oder Erhöhung der Menge und/oder der Aktivität von GI-GPx oder seiner Expression bewirken kann.

[0041] Der Begriff „Agens“ wird hier als Synonym für Regulator, Inhibitor, und/oder Aktivator verwendet. Somit bezieht sich der Begriff „Agens“ auf jede chemische oder biologische Verbindung, der eine Herab- oder Heraufregulierung, Senkung oder Steigerung, Unterdrückung oder Stimulierung, Deaktivierung oder Aktivierung oder anders geartete Regulierung oder Beeinflussung der Menge und/oder der Aktivität von GI-GPx und/oder der Expression von GI-GPx bewirken kann.

[0042] Zusätzlich zu der Rolle bei der Übertragung von genetischer Information von DNA auf Proteine nehmen RNA-Moleküle aktiv an vielen Prozessen in der Zelle teil. Beispiele dafür finden sich bei der Translation (rRNA, tRNA, tmRNA), bei dem intrazellulären Protein-Targeting (SRP), bei dem Kern-Spleißen von Prä-mRNA (snRNPs), mRNA-Editierung (gRNA) und X-Chromosom-Inaktivierung (Xist RNA). Jedes dieser RNA-Moleküle wirkt selbst als funktionales Produkt, ohne ein Protein zu codieren. Weil sich RNA-Moleküle in einzigartige Formen mit ausgeprägten strukturellen Merkmalen falten können, binden sich manche RNAs an spezielle Proteine oder kleine Moleküle (wie in den ATP-bindenden Aptameren), wohingegen andere bestimmte chemische Reaktionen katalysieren können. Somit können RNA-Aptamere dazu verwendet werden, um mit GI-GPx wechselzuwirken und dadurch die Aktivität und biologische Funktion dieser Peroxidase zu modulieren, regulieren, aktivieren oder zu inhibieren.

[0043] Der Begriff „Regulieren der Expression und/oder Aktivität“ bezieht sich wie er hier verwendet wird im Allgemeinen auf jeden Prozess, dessen Funktion darin besteht, die Menge oder Aktivität (Funktionalität) einer zellulären Komponente zu kon-

trollieren oder zu modulieren. Statische Regulierung erhält die Expression und/oder Aktivität auf einem bestimmten Niveau. Heraufregulierung bezieht sich auf eine relative Steigerung in der Expression oder Aktivität. Entsprechend bezieht sich Herabregulierung auf eine relative Senkung der Expression und/oder Aktivität. Herabregulierung ist synonym mit der Inhibition der Aktivität einer bestimmten zellulären Komponente.

[0044] Weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung betreffen Verfahren, um entweder die Expression von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in einem Individuum oder Zellen oder Zellkulturen zu regulieren, umfassend den Schritt der Verabreichung oder Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens an das Individuum oder die Zellen oder Zellkulturen, wobei das Agens zumindest teilweise die Transkription von DNA und/oder die Translation von RNA, welche die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase codieren, inhibiert oder senkt.

[0045] Therapeutika, pharmazeutisch aktive Agenzien oder Inhibitoren können jeweils Zellen eines Individuums in-vitro verabreicht werden oder können die in-vivo Verabreichung an das Individuum einbeziehen. Der Begriff „Individuum“ bezieht sich vorzugsweise auf Säugetiere, und besonders vorzugsweise auf Menschen. Wege der Verabreichung einer pharmazeutischen Zubereitung an das Individuum können die orale und parenterale, einschließlich der dermalen, intradermalen, intragastralen, intracutanen, intravasalen, intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen, intranasalen, intravaginalen, intrabukkalen, perkutanen, rektalen, subkutanen, sublingualen, topischen oder transdermalen Verabreichung umfassen, sind aber nicht auf diese Verabreichungswege beschränkt. Beispielsweise sind bevorzugte Zubereitungen in einer zur oralen Verabreichung geeigneten Form. Diese Verabreichungsformen umfassen beispielsweise Pillen, Tabletten, Filmtabletten, beschichtete Tabletten, Kapseln, Pulver und Deposite. Die Verabreichung an ein Individuum kann mittels einer einzigen Dosis oder wiederholten Verabreichungen erfolgen und kann in jeder einer Vielzahl von physiologisch geeigneten Formen an Salzen und/oder mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger, Bindemittel, Gleitmittel, Arzneimittelträger, Verdünnungsmittel oder Hilfsstoffen sein. Pharmazeutisch geeignete Salzformen und pharmazeutische Standard-Formulierungstechniken sind dem Fachmann geläufig.

[0046] Im Rahmen dieser Anmeldung bedeutet eine „pharmazeutisch wirksame Menge“ eines GI-GIPx-Aktivators eine Menge, die ausreicht, um entweder in den in-vitro behandelten Zellen oder Zellkulturen oder in dem in-vivo behandelten Subjekt den gewünschten physiologischen Effekt zu erzielen. Insbesondere ist eine pharmazeutisch wirksame Menge eine Menge, die ausreicht, um einen oder mehrere der mit der viralen Infektion in Verbindung stehenden,

klinisch definierten pathologischen Prozesse für einen bestimmten Zeitraum zu inhibieren. Die effektive Menge kann je nach ausgewähltem, speziellen Inhibitor oder Aktivator unterschiedlich sein, und hängt ebenfalls von unterschiedlichen, mit dem behandelten Subjekt und der Stärke der Infektion in Zusammenhang stehenden Faktoren und Zuständen ab. Wenn beispielsweise der Aktivator in-vivo verabreicht wird, würden Faktoren wie Alter, Gewicht, und Gesundheitszustand des Patienten, wie auch in vorklinischen Tierversuchen ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurven und Toxizitäts-Daten unter den berücksichtigten sein. Wenn der Aktivator mit Zellen oder Zellkulturen in-vitro in Kontakt gebracht wird, würde man eine Vielzahl von vorklinischen in-vitro-Studien entwickeln, um solche Parameter wie Aufnahme, Halbwertszeit, Dosis, Toxizität, etc. abzuschätzen. Die Bestimmung einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines bestimmten Agens fällt ohne weiteres in das Fachkönnen des Fachmanns.

[0047] Die vorliegende Offenbarung lehrt zum ersten Mal die Heraufregulierung von GI-GPx, das speziell an viralen Infektionen mit Hepatitis C-Viren beteiligt ist, mittels spezieller chemischer Verbindungen und Substanzen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, und Retinoide, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylierter der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR), und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (CD437; AHPN).

[0048] Das Polypeptid-Produkt der Genexpression kann ebenfalls untersucht werden, um den Grad der Expression zu bestimmen. Untersuchungsmethoden für Proteine umfassen, ohne darauf reduziert zu sein, Western Blotting, Immun-Präzipitation, Radioimmunoassay, Immun-Histochemie und Peptid-Immobilisierung in einem geordneten Array. Es sei allerdings gesagt, dass jede Methode zur spezifischen und quantitativen Bestimmung eines spezifischen Proteins oder mRNA eingesetzt werden kann.

[0049] Die vorliegende Erfindung schließt weiterhin durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit bekannte Methoden im Bereich der Auslegung von und Analyse mittels Mikro-Arrays ein. Diese Techniken schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, die Techniken ein, die in den folgenden Patenten und Patentanmeldungen beschrieben werden, die Arrays von Biopolymerverbindungen und Methoden zu deren Herstellung beschreiben:

U.S. Patente Nr.: 5,242,974; 5,384,261; 5,405,783; 5,412,087; 5,424,186; 5,429,807; 5,436,327; 5,445,934; 5,472,672; 5,527,681; 5,529,756; 5,545,531; 5,554,501; 5,556,752; 5,561,071; 5,559,895; 5,624,711; 5,639,603; 5,658,734; 5,807,522; 6,087,102; WO 93/17126; WO 95/11995; WO 95/35505; EP 742 287 und EP 799 897.

[0050] Die Techniken schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, ebenfalls die in den folgenden Pa-

tenten und Patentanmeldungen beschriebenen Techniken ein, in denen Verfahren beschrieben werden, in denen Arrays in unterschiedlichen Anwendungen eingesetzt werden:

U.S. Patente Nr. 5,143,854; 5,288,644; 5,324,633; 5,432,049; 5,470,710; 5,492,806; 5,503,980; 5,510,270; 5,525,464; 5,547,839; 5,580,732; 5,661,028; 5,994,076; 6,033,860; 6,040,138; 6,040,140;

WO 95/21265; WO 96/31622; WO 97/10365; WO 97/27317; EP 373 203 und EP 785 280.

[0051] Ein robustes Zellkulturen-System für das Hepatitis C-Virus (HCV) wurde nicht etabliert. Aus diesem Grund ist es extrem schwierig zu studieren, wie HCV Zellen infiziert werden, und antivirale Medikamente in Modellsystemen zu testen (Die einzigen Säugetiere, die infiziert werden können, sind Menschen und Schimpansen). Ein wesentlicher Schritt zum Entwerfen eines Kultivierungssystems für HCV wurde durch die Replikon-Zelllinien etabliert (Lohmann, V., Korner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285: 110 – 113). Replikation von subgenomischen HCV-RNAs in kultivierten Hepatozyten könnten erstmals erhalten werden. Diese subgenomischen Replikons sind nur aus dem Teil des HCV-Genoms zusammengesetzt, der für die nicht-strukturelle Proteine codiert, sind aber fähig, in Zellen repliziert zu werden und virale Proteine zu synthetisieren. Die Replikons, die in den oben zitierten wissenschaftlichen Artikel von Lohmann et al. beschrieben sind und für die vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden, ermöglichen die Studie der HCV-Replikation, Pathogenese und Evolution in der Zellkultur. Sie können auch die Durchführung von Tests auf Zellbasis für bestimmte Typen von antiviralen Medikamenten ermöglichen.

[0052] Kürzlich konnte gastrointestinale Glutathion-Peroxidase (GI-GPx) als Target bei der HCV-Replikation (siehe WO 02/084294) validiert werden. Wie oben erwähnt, gehört GI-GPx zu der Familie der Selenoproteine und spielt in den Abwehrmechanismen von eukariotischen Zellen gegen oxidative Schädigung eine wichtige Rolle, in dem sie unter Verwendung von Glutathion als das reduzierende Substrat die Reduktion einer Vielzahl von Hydroperoxiden katalysieren. Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Enzym als ein Mechanismus zum Schutz von zellulären Membransystemen gegenüber peroxidativer Schädigung wirkt. Selen als notwendiges Spurenelement weist auf die essentielle Funktion dieses Enzyms hin.

[0053] Selen wirkt in Säugetier-Systemen vorrangig in der Form von Selenoproteinen. Selenoproteine enthalten Selen in der Form von Selenocystein und führen eine Vielzahl von physiologischen Funktionen aus. Siebzehn Selenoproteine wurden identifiziert: Zelluläre oder klassische Glutathion-Peroxidase, Plasma- (oder extrazelluläre) Glutathion-Peroxidase, Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase,

gastrointestinale Glutathion-Peroxidase, Selenoprotein P, Iodthyronin-Deiodinase vom Typ 1, 2 und 3, Selenoprotein W, Thioredoxin-Reduktase und Selenophosphat-Synthetase. Von diesen sind zelluläre und Plasma-Glutathione-Peroxidase die funktionalen Parameter zur Bestimmung des Selen-Status (D.H. Holben, A.M. Smith, *J. Am. Diet. Assoc.* 1999, 99, 836–843).

[0054] Verglichen mit zum Schein transfizierten HuH7-Zellen ist GI-GPx in HCV-Replikonzellen drastisch herunter reguliert. Werden Replikonzellen gezwungen, GI-GPx zu re-exprimieren (beispielsweise durch Infektion mit einem GI-GPx enthaltenden Adenovirus), führt dies zu einer Reduzierung der subgenomischen HCV-RNA und des HCV-Proteins NS5a auf kaum noch nachweisbare Niveaus (siehe WO 02/084294). Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde die Kenntnis dieser inversen Korrelation zur Entwicklung einer Methode zum Heraufregulieren der Expression des zellulären, endogenen GI-GPx-Gens verwendet. Diese Heraufregulierung in den Replikonzellen verursacht eine Verarmung an HCV.

[0055] Es ist für den Fachmann ohne weiteres ersichtlich, dass andere geeignete Modifikationen und Anpassungen der Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegend beschriebenen Erfindung offensichtlich sind und vorgenommen werden können, ohne vom Umfang der vorliegenden Erfindung oder den hier offenbarten Ausführungsformen abzuweichen. Nachdem die vorliegende Erfindung im Detail beschrieben wurde, wird diese durch Bezug auf die nachfolgenden Beispiele klarer verstanden werden, wobei diese nur zum Zwecke der Anschauung aufgeführt sind, und nicht als Einschränkung der vorliegenden Erfindung gemeint sind.

Beispiele

[0056] Es wird Bezug genommen auf die Beispiele der WO 02/084294, die durch Bezugnahme hierin aufgenommen werden. Weiterhin wurden als Modellsystem für die HCV-Replikation drei Zelllinien verwendet, die von Prof. R. Bartenschlager (Universität Heidelberg, BRD) zur Verfügung gestellt wurden. Die Kulturen wurden für verschiedene Zeiträume mit all-trans-Retinsäure (RA) zu Vergleichszwecken und den anderen Agenzien Selen, Selenosalzen, Vitamin D₃ und Retinoide, wie 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR), und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (CD437; AHPN) (von der Firma Sigma bezogen) behandelt. Die Niveaus der GI-GPx-Expression wurde auf dem Protein-Niveau unter Verwendung von durch Prof. Brigelius-Flohe (Universität Potsdam, BRD) zur Verfügung gestellten Antikörpern durch Western Blotting und auf RNA-Niveau unter Verwendung von GI-GPx-spezifischen Oligonukleotiden als Sonden durch Northern Blotting gemessen. Die Niveaus von HCV-RNA wur-

den unter Verwendung eines DNA-Oligonukleotids, das zu dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen komplementär ist, als Sonde mittels Northern Blotting untersucht. Die Konzentration des viralen Proteins NS5a wurde mittels Western Blotting mit einem NS5a-spezifischen Antikörper (Biogenesis, UK) bestimmt.

[0057] Die Behandlung der Replikon-Zellen über drei Tage mit all-trans-Retinsäure (1 µm) hatte kaum eine Auswirkung auf die GI-GPx- und HCV-Expression. Nach sieben Tagen Inkubation wurde allerdings eine drastische Heraufregulierung der GI-GPx auf dem RNA- und Protein-Niveau (drei- bis zehnfach) festgestellt. Gleichzeitig wurde die Expression von subgenomischer HCV-RNA und des viralen Proteins NS5a um das zwei- bis fünffache herabreguliert, in Abhängigkeit der jeweils untersuchten Zelllinie. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, dass eine weitere Herabregulierung der HCV-RNA und des NS5a-Proteins von der Zugabe von Selen oder eines Selensalzes, beispielsweise Natriumselenit (50 nM), abhing. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Herabregulierung des HCV erstens durch die Aktivierung des GI-GPx-Gens auf dem Transkriptions-Niveau durch die Retinsäure und zweitens durch die Synthese von Selenoprotein(en), für die Natriumselenit benötigt wurde, gefördert wurde. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die durch all-trans-Retinsäure induzierte Herabregulierung von HCV unabhängig von der immanenten, durch Interferon induzierten Immunreaktion ist. Somit induzierte die all-trans-Retinsäure nicht die Transkription von PKR (doppelstrangige, RNA-abhängige Proteinkinase). Schwere zytotoxische Effekte wurden weder für all-trans-Retinsäure noch für Natriumselenit oder für beide zusammen in Kombination beobachtet.

[0058] Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Retinoide (in Kombination mit Selen oder Selensalzen wie Natriumselenit) zur Behandlung von HCV-positiven Patienten verwendet werden können. Insbesondere ist die Verwendung von Retinoiden mit einer hohen Spezifität zur Induktion der GI-GPx, wie N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (CD437; AHPN) bevorzugt. 4-HPR und AHPN zeigen signifikantes Potential als therapeutische Agenzien zur Prophylaxe und Behandlung einer Anzahl von prämaligen oder malignen Zuständen im Zusammenhang mit HCV-Infektionen. Tatsächlich zeigen die vorliegenden Daten, dass neben all-trans-Retinsäure andere Kern-Rezeptor-Liganden, wie beispielsweise 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure und Vitamin D₃ ebenfalls befähigt sind, die HCV-Belastung zu reduzieren.

[0059] All-trans-Retinsäure auf Replikonzellen über den Zeitraum von sechs Tagen führt zu einer Heraufregulierung von GI-GPx-RNA und Protein aufgrund der Tatsache, dass der GI-GPx-Promotor drei Retinsäure-Rezeptor-Erkennungselemente enthält. In der

Gegenwart von Selen oder einem Selensalz wie Natriumselenit wurde eine zwei- bis fünffache Reduzierung von HCV-RNA und HCV-NS5a-Protein ohne toxische Wirkungen beobachtet. Weiterhin zeigen die speziellen Retinoide wie N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (CD437; AHPN), 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure und Vitamin D₃, entweder allein oder in Kombination untereinander oder mit Selen oder einem Selensalz, eine ähnliche Wirkung.

[0060] Abschließend haben erste vorläufige Ergebnisse gezeigt, dass 9-cis-Retinsäure und seine oben genannten Alkyl- und Amid-Derivate HCV-RNA wesentlich besser herabregulieren als all-trans-Retinsäure allein.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, geeignet zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines an einer Hepatitis C Virus-(HCV)-Infektion und/oder zumindest an einer mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheit leidenden Individuums, wobei die Zusammensetzung zumindest ein Agens ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) umfasst.

2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei das Selensalz Natriumselenit ist.

3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Zusammensetzung weiterhin all-trans-Retinsäure umfasst.

4. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, weiterhin umfassend zumindest einen pharmazeutisch geeigneten Träger, Arzneimittelträger und/oder Verdünnungsmittel.

5. Verwendung zumindest eines der Agenzien Selen, Selensalze, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer Hepatitis C Virus-Infektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheit und/oder zur Prophylaxe gegen eine Hepatitis C Virus-Infektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheit.

6. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei das

Selensalz Natriumselenit ist.

7. Verwendung gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei die Zusammensetzung weiterhin all-trans-Retinsäure umfasst.

8. Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Hepatitis C-Virusinfektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheiten in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) an das Individuum.

9. Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Hepatitis C-Virusinfektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheiten in Zellen oder Zellkulturen umfassend den Schritt der Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) an das Individuum.

10. Verfahren zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) an das Individuum.

11. Verfahren zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in einer Zelle oder Zellkulturen umfassend den Schritt der Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN) zu den Zellen oder der Zellkultur.

12. Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Hepatitis C-Virusinfektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheiten in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und

6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), welches zumindest teilweise die Aktivität der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder welches zumindest teilweise die Produktion der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder stimuliert.

13. Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung einer Hepatitis C-Virusinfektion und/oder mit einer HCV-Infektion in Verbindung stehenden Krankheiten in Zellen oder Zellkulturen umfassend den Schritt der Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), welches zumindest teilweise die Aktivität der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder welches zumindest teilweise die Produktion der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder stimuliert.

14. Verfahren zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung an ein Individuum einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens zumindest teilweise die Aktivität der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder welches zumindest teilweise die Produktion der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder stimuliert.

15. Verfahren zur Regulierung der Produktion von Hepatitis C-Virus in Zellen oder einer Zellkultur umfassend den Schritt der Zugabe einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens in den Zellen oder der Zellkultur zumindest teilweise die Aktivität der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder wobei das Agens in der Zelle oder Zellkultur zumindest teilweise die Produktion der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase auslöst oder stimuliert.

16. Verfahren zur Regulierung der Expression von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung an ein Individuum einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens zumindest teilweise die Transkription von DNA und/oder die Translation von RNA, welche die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase codieren.

17. Verfahren zur Regulierung der Expression von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung an ein Individuum einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens zumindest teilweise die Transkription von DNA und/oder die Translation von RNA, welche die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase codieren.

18. Verfahren zur Regulierung der Expression von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in Zellen oder einer Zellkultur umfassend den Schritt der Zugabe zu den Zellen oder der Zellkultur einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens zumindest teilweise die Transkription von DNA und/oder die Translation von RNA, welche die humane, zelluläre, gastrointestinale Proteinglutathion-Peroxidase codieren.

19. Verfahren zur Regulierung der Aktivität von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in einem Individuum umfassend den Schritt der Verabreichung an das Individuum einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das

Agens mit der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase wechselwirkt.

20. Verfahren zur Regulierung der Aktivität von humaner, zellulärer, gastrointestinaler Proteinglutathion-Peroxidase in Zellen oder einer Zellkultur umfassend den Schritt der Zugabe zu den Zellen oder der Zellkultur einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Agens ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus Selen, Selensalzen, Vitamin D₃, 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylester der 9-cis-Retinsäure, C₁-C₁₀-Alkylamide der 9-cis-Retinsäure, N-(4-Hydroxyphenyl)retinsäureamid (4-HPR) und 6-[3-(1-Adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalincarbonsäure (AHPN), wobei das Agens mit der humanen, zellulären, gastrointestinalen Proteinglutathion-Peroxidase wechselwirkt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen